



DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets ⁶ : C12N 15/86, A61K 48/00, C12N 15/85, 7/04, A61K 39/235	AI	(11) Numéro de publication internationale: WO 95/14101
		(43) Date de publication internationale: 26 mai 1995 (26.05.95)
(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR94/01284	(81) Etats désignés: AM, AU, BB, BG, BR, BY, CA, CN, CZ, FI, GE, HU, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LK, LT, LV, MD, MG, MN, MW, NO, NZ, PL, RO, RU, SD, SI, SK, TJ, TT, UA, US, UZ, VN, brevet européen (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG), brevet ARIPO (KE, MW, SD, SZ).	
(22) Date de dépôt international: 7 novembre 1994 (07.11.94)		
(30) Données relatives à la priorité: 93/13766 18 novembre 1993 (18.11.93) FR		
(71) Déposant (<i>pour tous les Etats désignés sauf US</i>): RHONE-POULENC RORER S.A. [FR/FR]; 20, avenue Raymond-Aron, F-92160 Antony (FR).		
(72) Inventeurs; et (75) Inventeurs/Déposants (<i>US seulement</i>): DEDIEU, Jean-François [FR/FR]; 84, quai Jemmapes, F-75010 Paris (FR). LE ROUX, Aude [FR/FR]; 4, allée d'Alsace, F-94550 Chevilly-Larue (FR). FERRICAUDET, Michel [FR/FR]; 20, résidence du Moulin, F-28150 Ouarville (FR).	Publiée Avec rapport de recherche internationale.	
(74) Mandataire: BECKER, Philippe; Rhône-Poulenc Rorer S.A., Direction Brevets, 20, avenue Raymond-Aron, F-92160 Antony Cédex (FR).		

FILE COPY

(54) Title: RECOMBINANT ADENOVIRUSES FOR GENE THERAPY IN CANCERS

(54) Titre: ADENOVIRUS RECOMBINANTS POUR LA THERAPIE GENIQUE DES CANCERS

(57) Abstract

The invention concerns recombinant viruses comprising a heterologous DNA sequence under the control of expression signals specifically active in tumour cells, and their preparation and use in the treatment and prevention of cancers.

(57) Abrégé

La présente invention concerne des adénovirus recombinants comportant une séquence d'ADN hétérologue sous le contrôle de signaux d'expression actifs spécifiquement dans les cellules tumorales, leur préparation, et leur utilisation pour le traitement et/ou la prévention des cancers.

UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AT	Autriche	GB	Royaume-Uni	MR	Mauritanie
AU	Australie	GE	Géorgie	MW	Malawi
BB	Barbade	GN	Guinée	NE	Niger
BE	Belgique	GR	Grèce	NL	Pays-Bas
BF	Burkina Faso	HU	Hongrie	NO	Norvège
BG	Bulgarie	IE	Irlande	NZ	Nouvelle-Zélande
BJ	Bénin	IT	Italie	PL	Pologne
BR	Bresil	JP	Japon	PT	Portugal
BY	Belarus	KE	Kenya	RO	Roumanie
CA	Canada	KG	Kirghizistan	RU	Fédération de Russie
CF	République centrafricaine	KP	République populaire démocratique de Corée	SD	Soudan
CG	Congo	KR	République de Corée	SE	Suède
CH	Suisse	KZ	Kazakhstan	SI	Slovénie
CI	Côte d'Ivoire	LI	Liechtenstein	SK	Slovaquie
CM	Cameroon	LK	Sri Lanka	SN	Sénégal
CN	Chine	LU	Luxembourg	TD	Tchad
CS	Tchécoslovaquie	LV	Lettonie	TG	Togo
CZ	République tchèque	MC	Monaco	TI	Tadjikistan
DE	Allemagne	MD	République de Moldova	TT	Trinité-et-Tobago
DK	Danemark	MG	Madagascar	UA	Ukraine
ES	Espagne	ML	Mali	US	Etats-Unis d'Amérique
FI	Finlande	MN	Mongolie	UZ	Ouzbékistan
FR	France			VN	Viet Nam
GA	Gabon				

ADENOVIRUS RECOMBINANTS POUR LA THERAPIE GENIQUE DES CANCERS

La présente invention concerne des vecteurs recombinants d'origine virale et leur utilisation pour le traitement des cancers. Plus particulièrement, elle concerne des adénovirus recombinants comportant une séquence d'ADN hétérologue sous le contrôle de signaux d'expression actifs spécifiquement dans les cellules tumorales. L'invention concerne également la préparation de ces vecteurs, les compositions pharmaceutiques les contenant et leur utilisation en thérapie génique.

La thérapie génique consiste à corriger une déficience ou une anomalie (mutation, expression aberrante, etc) par introduction d'une information génétique dans la cellule ou l'organe affecté. Cette information génétique peut être introduite soit in vitro dans une cellule extraite de l'organe, la cellule modifiée étant alors réintroduite dans l'organisme, soit directement in vivo dans le tissu approprié. Différentes techniques ont été décrites pour l'introduction de cette information génétique, parmi lesquelles des techniques diverses de transfection impliquant des complexes d'ADN et de DEAE-dextran (Pagano et al., J.Virol. 1 (1967) 891), d'ADN et de protéines nucléaires (Kaneda et al., Science 243 (1989) 375), d'ADN et de lipides (Felgner et al., PNAS 84 (1987) 7413), l'emploi de liposomes (Fraleigh et al., J.Biol.Chem. 255 (1980) 10431), etc. Plus récemment, l'emploi de virus comme vecteurs pour le transfert de gènes est apparu comme une alternative prometteuse à ces techniques physiques de transfection. A cet égard, différents virus ont été testés pour leur capacité à infecter certaines populations cellulaires. En particulier, les rétrovirus (RSV, HMS, MMS, etc), le virus HSV, les virus adéno-associés, et les adénovirus.

De nombreuses applications de la thérapie génique sont en cours d'étude, telles que les maladies génétiques (myopathie, mucoviscidose, SCID, etc), les pathologies du système nerveux central (alzheimer, Parkinson, etc), les maladies cardiovasculaires (hémophilie, athérosclérose), le SIDA ou les cancers. Plus particulièrement, concernant le traitement des cancers, différentes stratégies ont été proposées dans l'art antérieur. Ainsi, la demande EP 259 212 décrit la préparation de vaccins destinés au traitement des cancers, comprenant un virus modifié capable d'exprimer un antigène spécifique d'une tumeur, permettant de générer une réponse immunitaire contre ces cellules. Par ailleurs, la demande WO91/15580 décrit la construction de rétrovirus contenant un gène codant pour un ribozyme, dont l'expression en culture cellulaire peut permettre de détruire un ARNm d'un oncogène.

Il est également connu de la demande WO 93/10814 d'utiliser des vecteurs exprimant des formes immunogéniques, non tumorigénique, d'oncogène cellulaires impliqués dans le développement des cancers. La demande WO 93/02556 décrit enfin l'utilisation de cellules prélevées dans la tumeur, modifiées génétiquement ex vivo par introduction d'un gène toxique, puis réadministrées au patient. Toutefois, cette approche impose des étapes de chirurgie, et de plus, la stabilité du gène toxique dans la cellule transformée ex vivo n'est pas démontrée.

Aussi, bien que des résultats intéressants aient été obtenus, les constructions décrites dans l'art antérieur ne permettent pas de résoudre de manière satisfaisante certaines difficultés, et notamment le ciblage précis des cellules à traiter. Ainsi, il a été proposé d'utiliser des rétrovirus recombinants comme vecteurs pour le transfert de gènes thérapeutiques. En effet, ces virus ne sont capables d'infecter que les cellules qui se divisent. Cependant, l'emploi de ce type de vecteur ne permet pas de cibler avec suffisamment de sélectivité les cellules tumorales. De plus, ces virus ne peuvent être obtenus avec des titres très élevés ce qui limite l'efficacité thérapeutique. Il a par ailleurs été proposé d'administrer directement le gène dans la tumeur. Ici encore, les risques de diffusion aux cellules environnantes ne sont pas exclus. Pour cette raison, il a été proposé de modifier la spécificité d'hôte des virus utilisés, en incorporant dans leur enveloppe des protéines reconnaissant des récepteurs spécifiques de cellules tumorales (WO93/00103; WO92/14829). Toutefois, ces constructions ne permettent pas d'obtenir des ciblage suffisants, notamment lorsque le virus utilisé code pour une protéine toxique destinée à la destruction des cellules.

La présente invention apporte une solution avantageuse à ces problèmes. Elle fournit en effet des vecteurs capables de diriger l'expression d'un gène donné sélectivement dans les cellules tumorales. La présente invention repose en particulier sur la mise en évidence que certains signaux de contrôle de la transcription sont actifs (ou activés) spécifiquement dans les cellules tumorales, et qu'ils peuvent être utilisés pour l'expression sélective de gène hétérologues. Elle résulte également de la mise en évidence que les adénovirus constituent des vecteurs particulièrement efficaces pour le transfert et l'expression de gènes thérapeutiques dans les cellules tumorales. En particulier, les adénovirus présentent l'avantage de ne pas s'intégrer au génome des cellules qu'ils infectent, de s'y maintenir de manière très stable ce qui permet d'obtenir un effet thérapeutique durable, et d'avoir un spectre d'hôte très large, ce qui permet une application au traitement de cancers affectant tout type de cellules. De plus, des adénovirus recombinants peuvent être obtenus avec des titres élevés, ce qui permet de

travailler à des multiplicités d'infection élevées, et d'introduire plusieurs copies du gène hétérologue par cellule. L'invention repose également sur la mise en évidence que les virus de type adénovirus sont capables d'incorporer des séquences hétérologues comprenant de tels promoteurs, de transférer ces séquences dans les cellules
5 tumorales, et d'exprimer des gènes désirés sous le contrôle de signaux spécifiques directement au niveau de tumeurs.

Un premier objet de l'invention réside donc dans un adénovirus recombinant défectif comprenant une séquence d'ADN hétérologue sous le contrôle de signaux d'expression actifs spécifiquement dans les cellules tumorales.

10 L'invention a également pour objet l'utilisation d'un tel adénovirus recombinant défectif pour la préparation d'une composition pharmaceutique destinée au traitement ou à la prévention des cancers.

Les adénovirus défectifs selon l'invention sont des adénovirus incapables de se répliquer de façon autonome dans la cellule cible. Généralement, le génome des
15 adénovirus défectifs utilisés dans le cadre de la présente invention est donc dépourvu au moins des séquences nécessaires à la réplication dudit virus dans la cellule infectée. Ces régions peuvent être soit éliminées (en tout ou en partie), soit rendues non-fonctionnelles, soit substituées par d'autres séquences et notamment par le gène inséré. Préférentiellement, le virus défectif conserve néanmoins les séquences de son génome
20 qui sont nécessaires à l'encapsidation des particules virales.

Il existe différents sérotypes d'adénovirus, dont la structure et les propriétés varient quelque peu. Néanmoins, ces virus ne sont pas pathogènes pour l'homme, et notamment les sujets non immuno-déprimés. Parmi ces sérotypes, on préfère utiliser
25 dans le cadre de la présente invention les adénovirus humains de type 2 ou 5 (Ad 2 ou Ad 5) ou les adénovirus d'origine animale (voir demande FR 93 05954). Parmi les adénovirus d'origine animale utilisables dans le cadre de la présente invention on peut citer les adénovirus d'origine canine, bovine, murine, (exemple : Mav1, Beard et al., Virology 75 (1990) 81), ovine, porcine, aviaire ou encore simienne (exemple : SAV). De préférence, l'adénovirus d'origine animale est un adénovirus canin, plus
30 préférentiellement un adénovirus CAV2 [souche manhattan ou A26/61 (ATCC VR-800) par exemple].

De préférence, on utilise dans le cadre de l'invention des adénovirus d'origine humaine ou canine ou mixte.

Comme indiqué ci-dessus, les adénovirus de l'invention portent une séquence
35 d'ADN hétérologue. Cette séquence d'ADN hétérologue permet l'expression d'une

activité biologique recherchée au niveau des cellules tumorales. De préférence, la séquence d'ADN hétérologue comprend au moins un gène choisi parmi un gène toxique pour la cellule infectée, un gène dont l'expression permet d'inhiber au moins partiellement la division cellulaire, ou un gène codant pour une lymphokine. Les
5 adénovirus de l'invention peuvent en outre comporter plusieurs de ces séquences, afin d'obtenir dans certains cas un effet synergique anti-tumoral.

Parmi les gènes toxiques pour la cellule infectée, on peut citer préférentiellement les gènes dont le produit d'expression confère à la cellule une sensibilité à un agent thérapeutique. Plus préférentiellement, le gène toxique est choisi
10 parmi le gène de la thymidine kinase, dont le produit d'expression confère aux cellules mammifères une sensibilité à certains agents thérapeutiques tels le ganciclovir ou l'acyclovir. La thymidine kinase du virus de l'herpès simplex est capable de phosphoryler les analogues de nucléosides tels que l'acyclovir et le ganciclovir. Ces molécules modifiées peuvent être incorporées dans une chaîne d'ADN encours
15 d'élongation, ce qui a pour conséquence l'arrêt de la synthèse d'ADN, entraînant la mort de la cellule (F.L. Moolten, Cancer Res. 46 (1986) 5276). Cette stratégie permet ainsi d'éliminer spécifiquement les cellules exprimant le gène suicide. De plus, la synthèse d'ADN étant la cible de la toxicité, seules les cellules encours de division sont affectées.

20 Plus préférentiellement, on utilise dans le cadre de la présente invention le gène de la thymidine kinase du virus de l'herpès humain (hTK HSV-1). La séquence de ce gène a été décrite dans la littérature (voir notamment McKnight et al., Nucleic Acid. Res. 8 (1980) 5931).

Il est également possible d'utiliser le gène de la cytosine désaminase, dont le
25 produit d'expression confère aux cellules mammifères une sensibilité à la 5-fluorocytosine (5-FC). Par ailleurs, parmi les gènes toxiques utilisables dans le cadre de la présente invention, on peut citer également les gènes dont le produit d'expression induit une apoptose de la cellule infectée.

Parmi les gènes dont l'expression permet d'inhiber au moins partiellement la
30 division cellulaire, on peut citer plus particulièrement les gènes suppresseur de tumeur (ou anti-oncogène) ou tout dérivé actif de ceux-ci; les séquences antisens ou les ribozymes, dont l'expression dans la cellule cible permet d'inhiber au moins partiellement l'expression de gènes favorisant la division cellulaire.

Parmi les gènes suppresseurs de tumeur utilisables dans le cadre de la
35 présente invention, on peut citer plus particulièrement le gène p53 (Baker et coll.,

Science 244 (1989) 217); le gène Rb (Friend et coll., Nature 323 (1986) 643; Huang et coll., Science 242 (1988) 1563), le gène rap 1A (Kitayama et coll., Cell 56 (1989) 77); le gène DCC (Fearon et coll., Science 247 (1990) 49), les gènes k-rev2 et k-rev3; ou tout autre gène suppresseur de tumeur décrit dans la littérature (Cf part exemple WO 91/15580).

La séquence d'ADN hétérologue peut également comprendre une séquence antisens, dont l'expression dans la cellule cible permet de contrôler l'expression de gènes favorisant la prolifération cellulaire. Ce contrôle peut intervenir au niveau de la transcription, du splicing du pré-messager, de la dégradation du messager, de sa traduction en protéine, ou de modifications post-traductionnelles. Préférentiellement, la séquence d'ADN hétérologue comporte un gène codant pour un ARN antisens capable de contrôler la traduction d'un ARNm cible (EP 140 308). Parmi les séquences antisens utilisables dans le cadre de l'invention, on peut citer plus particulièrement toute séquence antisens permettant de diminuer les niveaux de production des oncogènes ras, myc, fos, c-erb B, etc.

Parmi les gènes codant pour des lymphokines, on peut citer plus particulièrement les gènes codant pour les interleukines (IL-1 à IL-3 de préférence), les interférons, les facteurs de nécrose des tumeurs, les facteurs de stimulation des colonies (G-CSF, M-CSF, GM-CSF, etc), le TGF- β , etc. Par ailleurs, le gène codant pour la lymphokine comprend généralement, en amont de la séquence codante, une séquence signal dirigeant le polypeptide synthétisé dans les voies de sécrétion de la cellule cible. Cette séquence signal peut être la séquence signal naturelle de la lymphokine, mais il peut également s'agir de toute autre séquence signal fonctionnelle, ou d'une séquence signal artificielle. De telles constructions permettent en particulier d'augmenter les taux de lymphokine de manière très localisée, et ainsi, en présence d'un antigène spécifique de tumeur, d'amplifier la réponse immunitaire contre un type particulier de tumeur, ce qui donne un effet particulièrement avantageux.

Comme indiqué ci-dessus, la séquence d'ADN hétérologue est placée sous le contrôle de signaux d'expression actifs spécifiquement dans les cellules tumorales. De cette façon, le gène utilisé n'est exprimé et ne produit son effet que lorsque le virus a effectivement infecté une cellule tumorale.

Dans un mode de réalisation préféré de l'invention, il s'agit de signaux d'expression induits par ou actifs en présence de virus responsables ou associés à des tumeurs. Encore plus préférentiellement, on utilise dans le cadre de la présente

invention un signal d'expression inductible par le virus d'Epstein-Barr (EBV) ou par le virus du papillome.

Le virus d'Epstein-Barr (EBV) est associé à deux types de cancers humains : le lymphome de Burkitt et le cancer du nasopharynx. L'utilisation d'un adénovirus recombinant comprenant un gène toxique sous le contrôle d'un promoteur inductible par l'EBV permet avantageusement d'exprimer spécifiquement ce gène toxique dans les cellules tumorales du nasopharynx. Dans les biopsies de cancers du nasopharynx, un seul antigène nucléaire est régulièrement présent, EBNA1, qui est impliqué dans la maintenance du génome viral dans les cellules infectées par l'EBV en phase latente, et qui transactive le promoteur viral BCR2. Un objet particulier de l'invention réside donc dans l'utilisation, pour l'expression spécifique d'un gène dans les cellules de cancers du nasopharynx, d'une séquence répondant à EBNA1 (EBNA1-RE : EBNA1 "responsive element"). En particulier, l'invention concerne un adénovirus comprenant comme signal d'expression un promoteur chimère comprenant une séquence répondant à EBNA1 fusionnée en amont d'un autre promoteur viral, le promoteur du gène de la terminale protéine 1 (TP1). Les exemples décrits dans la présente demande montrent bien que ce promoteur chimère est inductible par EBNA1.

Les virus du papillome (notamment le virus HPV 16 et 18) sont responsables de 90 % des cancers du cervix chez la femme et ont été identifiés dans des lésions épithéliales pré-cancéreuses (Riou et al., Lancet 335 (1990) 117). Le produit du gène E6 conduit à la formation de tumeurs en diminuant fortement la quantité de p53 sauvage, un anti-oncogène, dans les cellules HPV-positives (Wrede et al., Mol. Carcinog. 4 (1991) 171). L'utilisation d'un adénovirus recombinant comprenant un gène toxique sous le contrôle d'un promoteur inductible par le HPV (par exemple la protéine E6) permet avantageusement d'exprimer spécifiquement ce gène toxique dans les cellules tumorales correspondantes.

Il peut encore s'agir de signaux d'expression inactifs dans les cellules normales et actifs dans les cellules tumorales. En particulier, on peut utiliser dans le cadre de la présente invention le promoteur de l α -foetoprotéine (Alpert E., dans Hepatocellular carcinoma, Okuda & Peters (eds), New York, 1976, 353) ou le promoteur P3 de l'IGF-II (Sussenbach et al., Growth Regulation 2 (1992) 1), qui sont actifs chez l'adulte, uniquement dans les hépatocarcinomes. Il est également possible d'utiliser des promoteurs induits par des hormones dans le cas de tumeurs hormono-dépendantes ou hormonales associées (tumeur du sein ou de la prostate par exemple).

En outre, ces séquences promotrices peuvent être modifiées par addition de séquences d'activation, de régulation, etc.

Les adénovirus recombinants défectifs selon l'invention peuvent être préparés par toute technique connue de l'homme du métier (Levrero et al., Gene 101 (1991) 195, EP 185 573; Graham, EMBO J. 3 (1984) 2917). En particulier, ils peuvent être préparés par recombinaison homologue entre un adénovirus et un plasmide portant entre autre la séquence d'ADN hétérologue. La recombinaison homologue se produit après co-transfection desdits adénovirus et plasmide dans une lignée cellulaire appropriée. La lignée cellulaire utilisée doit de préférence (i) être transformable par lesdits éléments, et (ii), comporter les séquences capables de compléter la partie du génome de l'adénovirus défectif, de préférence sous forme intégrée pour éviter les risques de recombinaison. A titre d'exemple de lignée, on peut mentionner la lignée de rein embryonnaire humain 293 (Graham et al., J. Gen. Virol. 36 (1977) 59) qui contient notamment, intégrée dans son génome, la partie gauche du génome d'un adénovirus Ad5 (12 %). Des stratégies de construction de vecteurs dérivés des adénovirus ont également été décrites dans les demandes n° FR 93 05954 et FR 93 08596.

Ensuite, les adénovirus qui se sont multipliés sont récupérés et purifiés selon les techniques classiques de biologie moléculaire, comme illustré dans les exemples.

La présente invention concerne également une composition pharmaceutique comprenant un ou plusieurs adénovirus recombinants défectifs tels que décrits précédemment. De préférence, les compositions pharmaceutiques de l'invention contiennent un véhicule pharmaceutiquement acceptable pour une formulation directement injectable dans les tumeurs à traiter. Il peut s'agir en particulier de solutions stériles, isotoniques, ou de compositions sèches, notamment lyophilisées, qui, par addition selon le cas d'eau stérilisée ou de sérum physiologique, permettent la constitution de solutés injectables. L'injection directe dans la tumeur à traiter est avantageuse car elle permet de concentrer l'effet thérapeutique au niveau des tissus affectés. Toutefois, il est également possible d'utiliser des compositions pharmaceutiques formulées en vue d'administrations par voie topique, orale, parentérale, intranasale, intraveineuse, intramusculaire, sous-cutanée, intraoculaire, transdermique, etc.

Les doses d'adénovirus recombinant défectif utilisées pour l'injection peuvent être adaptées en fonction de différents paramètres, et notamment en fonction du mode d'administration utilisé, de la pathologie concernée, du gène à exprimer, ou encore de la durée du traitement recherchée. D'une manière générale, les adénovirus

recombinants selon l'invention sont formulés et administrés sous forme de doses comprises entre 10^4 et 10^{14} pfu/ml, et de préférence 10^6 à 10^{10} pfu/ml. Le terme pfu ("plaque forming unit") correspond au pouvoir infectieux d'une solution de virus, et est déterminé par infection d'une culture cellulaire appropriée, et mesure, généralement
5 après 48 heures, du nombre de plages de cellules infectées. Les techniques de détermination du titre pfu d'une solution virale sont bien documentées dans la littérature.

La présente invention offre ainsi un moyen très efficace pour le traitement ou la prévention des cancers. Elle est tout particulièrement adaptée au traitement des
10 cancers du nasopharynx ou des hépatocarcinomes.

En outre, ce traitement peut concerner aussi bien l'homme que tout animal tel que les ovins, les bovins, les animaux domestiques (chiens, chats, etc), les chevaux, les poissons, etc.

La présente invention sera plus complètement décrite à l'aide des exemples
15 qui suivent, qui doivent être considérés comme illustratifs et non limitatifs.

Légende des figures

Figure 1 : Représentation du vecteur pONT-tk

Figure 2 : Représentation du vecteur pONT-B-gal

Techniques générales de biologie moléculaire

20 Les méthodes classiquement utilisées en biologie moléculaire telles que les extractions préparatives d'ADN plasmidique, la centrifugation d'ADN plasmidique en gradient de chlorure de césium, l'électrophorèse sur gels d'agarose ou d'acrylamide, la purification de fragments d'ADN par électroélution, les extractions de protéines au phénol ou au phénol-chloroforme, la précipitation d'ADN en milieu salin par de
25 l'éthanol ou de l'isopropanol, la transformation dans *Escherichia coli*, etc ... sont bien connues de l'homme de métier et sont abondamment décrites dans la littérature [Maniatis T. et al., "Molecular Cloning, a Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y., 1982; Ausubel F.M. et al. (eds), "Current Protocols in Molecular Biology", John Wiley & Sons, New York, 1987].

30 Les plasmides de type pBR322, pUC et les phages de la série M13 sont d'origine commerciale (Bethesda Research Laboratories).

Pour les ligatures, les fragments d'ADN peuvent être séparés selon leur taille par électrophorèse en gels d'agarose ou d'acrylamide, extraits au phénol ou par un

mélange phénol/chloroforme, précipités à l'éthanol puis incubés en présence de l'ADN ligase du phage T4 (Biolabs) selon les recommandations du fournisseur.

Le remplissage des extrémités 5' proéminentes peut être effectué par le fragment de Klenow de l'ADN Polymérase I d'E. coli (Biolabs) selon les spécifications du fournisseur. La destruction des extrémités 3' proéminentes est effectuée en présence de l'ADN Polymérase du phage T4 (Biolabs) utilisée selon les recommandations du fabricant. La destruction des extrémités 5' proéminentes est effectuée par un traitement ménagé par la nucléase S1.

La mutagenèse dirigée in vitro par oligodéoxynucléotides synthétiques peut être effectuée selon la méthode développée par Taylor et al. [Nucleic Acids Res. **13** (1985) 8749-8764] en utilisant le kit distribué par Amersham.

L'amplification enzymatique de fragments d'ADN par la technique dite de PCR [Polymérase-catalyzed Chain Reaction, Saiki R.K. et al., Science **230** (1985) 1350-1354; Mullis K.B. et Faloona F.A., Meth. Enzym. **155** (1987) 335-350] peut être effectuée en utilisant un "DNA thermal cycler" (Perkin Elmer Cetus) selon les spécifications du fabricant.

La vérification des séquences nucléotidiques peut être effectuée par la méthode développée par Sanger et al. [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **74** (1977) 5463-5467] en utilisant le kit distribué par Amersham.

20 **Exemples**

Exemple 1. Construction du vecteur Ad-ONT-tk portant le gène tk sous le contrôle d'un promoteur chimère EBNA1-RE/TP1 (figure 1).

Cet exemple décrit la construction d'un adénovirus recombinant comprenant le gène de la thymidine kinase du virus de l'herpès simplex (tk) sous le contrôle d'un promoteur spécifiquement actif dans les cellules infectées par le virus EBV (promoteur chimère EBNA1-RE/TP1).

1.1. Construction du plasmide p7tk1

Cet exemple décrit la construction du plasmide p7tk1 contenant la phase ouverte de lecture du gène tk de 1131 paires de bases (ATG 114-116 et codon stop TGA 1242-1244), insérée dans un multisite de clonage.

Le fragment BglIII-NcoI contenant le gène de la thymidine kinase (tk) du virus herpès simplex type 1 a été isolé à partir du plasmide pHSV-106 (commercialisé par Gibco BRL), réparé par l'action du fragment klenow puis inséré au site SmaI du

plasmide pGEM7zf(+) (commercialisé par Promega). Les sites SmaI et BgIII sont détruits lors de cette étape, le site NcoI est conservé.

Le plasmide obtenu a été désigné p7tk1.

1.2. Construction du plasmide pONT1

Cet exemple décrit la construction d'un plasmide contenant un promoteur chimère constitué d'une séquence nécessaire à la transactivation par l'antigène EBNA1 et du promoteur TP1 du virus EBV.

Le fragment EcoRI(7315)-SmaI(8191) du virus EBV a été isolé à partir de la souche B95-8. La séquence complète du virus EBV a été décrite par Baer et al. (Nature 310 (1984) 207). Ce fragment contient les séquences nécessaires à la transactivation par l'antigène nucléaire 1 (EBNA1) (D. Reisman & B. Sugden, 1986, Molecular and Cellular Biology, vol. 6 pp. 3838-3846). Ce fragment a ensuite été fusionné au fragment NruI(166 241)-PstI(166 559) de l'EBV B95-8 (le site PstI a été digéré par la polymérase T4), contenant le promoteur TP1. Le promoteur chimère ainsi obtenu a ensuite été inséré dans le multisite de clonage du plasmide pBluescript II SK.

Le plasmide obtenu a été désigné pONT1.

1.3. Construction du plasmide pONTtk

Le plasmide pONTtk comporte le gène de la thymidine kinase du virus de l'herpès simplex (tk) cloné dans le plasmide p7tk1, sous le contrôle du promoteur chimère EBNA1-RE/TP1 cloné dans le plasmide pONT1.

Pour construire ce plasmide, le fragment BamHI-XhoI de pONT1 qui contient le promoteur chimère transactivé par EBNA-1 et EBNA-2, et le fragment XhoI-ClaI de p7tk1 qui contient la phase ouverte de lecture de tk ont été clonés aux sites BamHI (478) et ClaI (4550) du plasmide pAd.RSV β gal. Le plasmide pAd.RSV β Gal contient, dans l'orientation 5'->3',

- le fragment PvuII correspondant à l'extrémité gauche de l'adénovirus Ad5 comprenant : la séquence ITR, l'origine de réplication, les signaux d'encapsidation et l'amplificateur E1A;

- le gène codant pour la β -galactosidase sous le contrôle du promoteur RSV (du virus du sarcome de Rous),

- un second fragment du génome de l'adénovirus Ad5, qui permet la recombinaison homologue entre le plasmide pAd.RSV β Gal et l'adénovirus d1324. Le

plasmide pAd.RSV β gal a été décrit par Stratford-Perricaudet et al. (J. Clin. Invest. 90 (1992) 626).

Tous les sites de clonage sont conservés. Le plasmide obtenu a été désigné pONTtk (figure 1).

5 1.4. Construction de l'adénovirus recombinant Ad-ONT-tk

Le vecteur pONTtk a été linéarisé et cotransfecté avec un vecteur adénoviral déficient, dans les cellules helper (lignée 293) apportant en *trans* les fonctions codées par les régions E1 (E1A et E1B) d'adénovirus.

10 Plus précisément, l'adénovirus Ad-ONT-tk a été obtenu par recombinaison homologue in vivo entre l'adénovirus mutant Ad-d1324 (Thimmappaya et al., Cell 31 (1982) 543) et le vecteur pONTtk, selon le protocole suivant : le plasmide pONTtk, linéarisé par XmnI, et l'adénovirus d1324, linéarisé par l'enzyme ClaI, ont été co-transfectés dans la lignée 293 en présence de phosphate de calcium, pour permettre la recombinaison homologue. Les adénovirus recombinants ainsi générés ont été
15 sélectionnés par purification sur plaque. Après isolement, l'ADN de l'adénovirus recombinant a été amplifié dans la lignée cellulaire 293, ce qui conduit à un surnageant de culture contenant l'adénovirus déficient recombinant non purifié ayant un titre d'environ 10^{10} pfu/ml.

20 Les particules virales sont généralement purifiées par centrifugation sur gradient de chlorure de césium selon les techniques connues (voir notamment Graham et al., Virology 52 (1973) 456). L'adénovirus Ad-ONT-tk peut être conservé à -80°C dans 20 % de glycérol.

Exemple 2. Construction du vecteur Ad-ONT- β gal

25 Cet exemple décrit la construction d'un adénovirus recombinant comprenant le gène de la bêta-galactosidase d'E.coli (β gal) sous le contrôle d'un promoteur spécifiquement actif dans les cellules infectées par le virus EBV (promoteur chimère EBNA1-RE/TP1).

2.1. Construction du plasmide pONT- β gal

30 Le fragment XbaI-(HindIII) du plasmide pONT1 qui contient le promoteur chimère transactivé par EBNA-1 et EBNA-2 et le fragment (StuI)-KpnI du plasmide pAd.RSV β gal qui contient le gène de la β -galactosidase ont été clonés aux sites XbaI (484) et KpnI (4520) du plasmide pAd.RSV β gal. Les sites HindIII et StuI sont

détruits au cours de cette étape. Le plasmide obtenu a été désigné pONT- β gal (figure 2).

2.2. Construction de l'adénovirus Ad-ONT- β gal

Le vecteur pONT- β gal obtenu dans l'exemple 2.1, a été utilisé, par recombinaison homologue selon le protocole décrit dans l'exemple 1.4., pour préparer un adénovirus recombinant comprenant le gène de la β -galactosidase d'E.coli (β gal) sous le contrôle du promoteur chimère EBNA1-RE/TP1. L'adénovirus Ad-ONT1- β gal ainsi obtenu peut être conservé à -80°C dans 20 % de glycérol.

Exemple 3. Construction du vecteur pONT-CAT

Cet exemple décrit la construction d'un vecteur comprenant le gène de la chloramphénicol acétyl transférase (CAT) sous le contrôle d'un promoteur spécifiquement actif dans les cellules infectées par le virus EBV (promoteur chimère EBNA1-RE/TP1).

3.1. Construction du vecteur

Le promoteur TP1 de l'EBV a été isolé sous la forme du fragment NruI(166241)-PstI(166559) de l'EBV. Ce fragment a ensuite été fusionné au gène CAT, et inséré, sous forme d'un fragment NruI-BamHI, dans le plasmide pGem7ZF (Promega). Le plasmide résultant a été désigné pTP1-CAT. Le fragment NruI-BamHI du plasmide pTP1-CAT a ensuite été fusionné, en aval du fragment EcoRI(7315)-SmaI(8191) de l'EBV souche B95-8, contenant les séquences nécessaires à la transactivation par EBNA1 (Cf exemple 1.2.). Le fragment obtenu, comprenant le gène CAT sous contrôle du promoteur chimère EBNA1-RE/TP1, a été inséré aux sites EcoRI et BamHI du plasmide pBluescript SK pour générer le plasmide pONT-CAT. Un plasmide a également été construit dans lequel les éléments de réponse à l'antigène EBNA2 du promoteur TP1 ont été délétés. Pour cela, le promoteur TP1 a été isolé sous la forme du fragment NruI(166375)-PstI(166559) de l'EBV. Ce plasmide a été désigné pOST-CAT.

3.2. Activité in vitro

Cet exemple démontre que les constructions décrites ci-dessus sont induites spécifiquement par des antigènes du virus d'Epstein Barr.

Les vecteurs pONT-CAT, pOST-CAT et pTP1-CAT ont été transfectés par électroporation dans une lignée de lymphocytes B EBV⁻ (cellules DG75), soit seuls,

soit en présence de vecteurs d'expression des antigènes viraux EBNA1, EBNA2 ou EBNA1 + EBNA2. 48 heures après la transfection, les cellules ont été lysées par congélation/décongélation, les débris cellulaires éliminés, puis les extraits obtenus ont été normalisés suivant la quantité de protéines. L'activité CAT a ensuite été dosée dans

5 ces extraits par dosage enzymatique. Les résultats obtenus sont les suivants :

	Seul	+EBNA2	+EBNA1	+EBNA1/A2
pTP1-CAT	1	35	2,5	17
pONT-CAT	1	16	34	136
pOST-CAT	1	1,4	19,5	22,5

Ces résultats montrent clairement que le promoteur ONT est spécifiquement actif en présence des antigènes EBNA1 et EBNA2, et qu'il induit une très forte expression du gène CAT.

REVENDICATIONS

1. Adénovirus recombinant défectif comprenant une séquence d'ADN hétérologue sous le contrôle de signaux d'expression actifs spécifiquement dans les cellules tumorales.
- 5 2. Adénovirus selon la revendication 1 caractérisé en ce qu'il est dépourvu des régions de son génome qui sont nécessaires à sa réplication dans la cellule cible.
3. Adénovirus selon la revendication 2 caractérisé en ce qu'il s'agit d'un adénovirus humain de type Ad 5 ou canin de type CAV-2.
4. Adénovirus selon l'une des revendications 1 à 3 caractérisé en ce que la
10 séquence d'ADN hétérologue contient au moins un gène toxique pour la cellule infectée.
5. Adénovirus selon la revendication 4 caractérisé en ce que le gène toxique est un gène dont le produit d'expression confère à la cellule infectée une sensibilité à un agent thérapeutique.
- 15 6. Adénovirus selon la revendication 5 caractérisé en ce que le gène toxique est le gène de la thymidine kinase et l'agent thérapeutique est le gancyclovir ou l'acyclovir.
7. Adénovirus selon l'une des revendications 1 à 3 caractérisé en ce que la
 séquence d'ADN hétérologue contient au moins un gène dont l'expression permet
20 d'inhiber au moins partiellement la division cellulaire.
8. Adénovirus selon la revendication 7 caractérisé en ce que le gène est choisi parmi les gènes suppresseur de tumeur, les séquences antisens et les ribozymes.
9. Adénovirus selon la revendication 4 caractérisé en ce que la séquence
 d'ADN hétérologue contient au moins un gène dont le produit d'expression induit
25 l'apoptose de la cellule infectée.
10. Adénovirus selon l'une des revendications 1 à 9 caractérisée en ce qu'il comprend des signaux d'expression induits par ou actifs en présence de virus responsables ou associés à des tumeurs.

11. Adénovirus selon la revendication 10 caractérisé en ce qu'il comprend un signal d'expression inductible par le virus d'Epstein-Barr (EBV) ou par le virus du papillome.
12. Adénovirus selon la revendication 11 caractérisé en ce que le signal d'expression comprend une séquence répondant à l'antigène EBNA1.
13. Adénovirus selon la revendication 12 caractérisé en ce que le signal d'expression est constitué d'un promoteur chimère comprenant une séquence répondant à EBNA1 fusionnée en amont d'un autre promoteur viral, de préférence le promoteur du gène de la terminale protéine 1 (TP1).
14. Adénovirus selon l'une des revendications 1 à 9 caractérisée en ce qu'il comprend des signaux d'expression choisis parmi le promoteur de l' α -foetoprotéine et le promoteur P3 de l'IGF-II.
15. Utilisation d'un adénovirus selon l'une des revendications 1 à 14 pour la préparation d'une composition pharmaceutique destinée au traitement et/ou à la prévention des cancers.
16. Utilisation d'un adénovirus selon la revendication 12 pour la préparation d'une composition pharmaceutique destinée au traitement et/ou à la prévention des cancers du nasopharynx.
17. Utilisation selon la revendication 15 ou 16 pour la préparation d'une composition pharmaceutique en vue d'une administration directe dans la tumeur à traiter.
18. Composition pharmaceutique comprenant un ou plusieurs adénovirus recombinants défectifs selon l'une des revendications 1 à 14.
19. Composition pharmaceutique selon la revendication 18 caractérisée en ce qu'elle est sous forme injectable.
20. Composition pharmaceutique selon la revendication 18 caractérisée en ce qu'elle comprend entre 10^4 et 10^{14} pfu/ml, et de préférence 10^6 à 10^{10} pfu/ml adénovirus recombinants défectifs.

21. Promoteur chimère comprenant une séquence répondant à EBNA1 fusionnée en amont d'un autre promoteur viral, de préférence le promoteur du gène de la terminale protéine 1 (TP1).

1/2

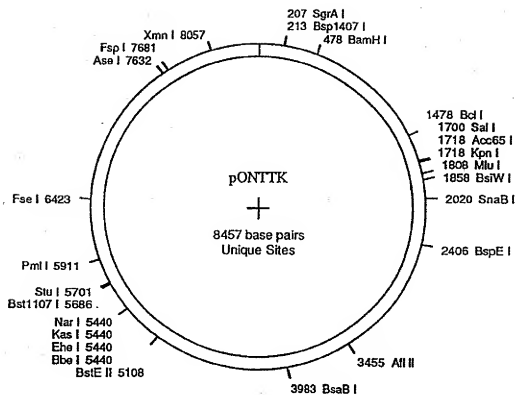


FIGURE 1

2/2

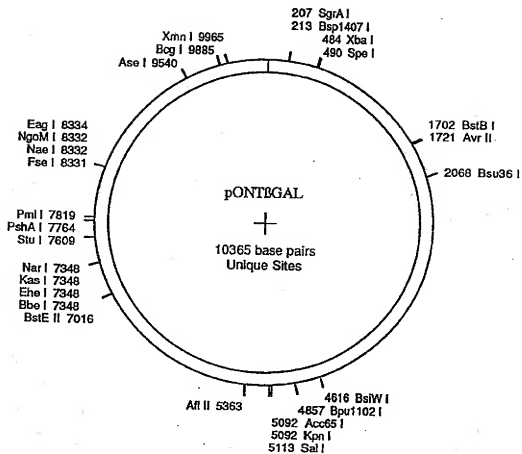


FIGURE 2

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/FR 94/01284A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 6 C12N15/86 A61K48/00 C12N15/85 C12N7/04 A61K39/235

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 C12N A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P, X	JOURNAL OF HEPATOLOGY, vol.21, no.SUP1, 1994 page S10 ARBUTHNOT, P.B. ET AL. 'Targeted gene transfer by adenoviral and retroviral vectors in hepatocellular carcinoma cells' see the whole document & 29th Annual Meeting of the European Association for the Study of the Liver Athènes, Grèce. 7 to 10 september 1994 --- -/-	1, 14, 15, 18

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
 "E" earlier document but published on or after the international filing date
 "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
 "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
 "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"I" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to undermine the principle or theory underlying the invention
 "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
 "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
 "&" document number of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

21 February 1995

Date of mailing of the international search report

- 9. 03. 95

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.O. 5818 Patentaan 2
 NL - 2280 HV Rijswijk
 Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
 Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Chambonnet, F

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/FR 94/01284

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P,X	JOURNAL OF NEUROSCIENCE RESEARCH, vol.39, no.4, 1 November 1994 pages 506 - 511 PEREZ-CRUET, M.J. ET AL. 'Adenovirus mediated gene therapy of experimental gliomas' see the whole document ---	1-7
P,X	CANCER RESEARCH, vol.54, no.20, 15 October 1994 pages 5258 - 5261 OSAKI, T. ET AL. 'Gene therapy for carcinoembryonic antigen-producing human lung cancer cells by cell type-specific expression of herpes simplex virus thymidine kinase' see the whole document ---	1
P,X	PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA., vol.91, no.8, 12 April 1994, WASHINGTON US pages 3054 - 3057 CHEN, S.H. ET AL. 'Gene therapy for brain tumors: regression of experimental gliomas by adenovirus-mediated gene transfer in vivo' see the whole document ---	1
Y	WO,A,93 19191 (CNRS INSTITUT GUSTAVE ROUSSY) 30 September 1993 see the whole document ---	1-8,15, 17-19
Y	EP,A,0 415 731 (WELLCOME FOUNDATION LTD) 6 March 1991 see the whole document ---	1-4,8, 15,17-19
Y	WO,A,92 05262 (JOHN HOPKINS UNIVERSITY) 2 April 1992 see the whole document ---	1-7,15, 17-19
Y	EP,A,0 475 623 (REGENTS OF THE UNIVERSITY OF CALIFORNIA) 18 March 1992 see the whole document -----	1-7,15, 17-19

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No.

PCT/FR 94/01284

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO-A-9319191	30-09-93	FR-A-	2688514
		AU-B-	3757093
		CA-A-	2102302
		EP-A-	0593755
		HU-A-	66486
		JP-T-	6508039
		NO-A-	934061
EP-A-0415731	06-03-91	AU-B-	647747
		AU-A-	6199190
		AU-B-	6458794
		CN-A-	1050899
		JP-A-	3172189
WO-A-9205262	02-04-92	AU-A-	8764391
		CA-A-	2091346
		EP-A-	0551401
		JP-T-	6501161
EP-A-0475623	18-03-92	AU-B-	653356
		AU-A-	8262991

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande Internationale No.

PCT/FR 94/01284

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE

CIB 6 C12N15/86 A61K48/00 C12N15/85 C12N7/04 A61K39/235

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

CIB 6 C12N A61K

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés)

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
P, X	<p>JOURNAL OF HEPATOLOGY, vol.21, no.SUP1, 1994 page S10 ARBUTHNOT, P.B. ET AL. 'Targeted gene transfer by adenoviral and retroviral vectors in hepatocellular carcinoma cells' voir le document en entier & 29th Annual Meeting of the European Association for the Study of the Liver Athènes, Grèce. 7 au 10 Septembre 1994</p> <p style="text-align: center;">--- -/-</p>	1, 14, 15, 18

☒ Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

☒ Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

*** Catégories spéciales de documents cités:**

- 'A' document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- 'E' document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- 'L' document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (elle qu'indiquée)
- 'O' document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- 'P' document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

- 'T' document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention
- 'X' document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément
- 'Y' document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier
- 'A' document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée	Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale
21 Février 1995	- 3. 03. 95
Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale Office Européen des Brevets, P.B. 3818 Patentlaan 2 NL - 2280 EV Rijswijk Tél. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax (+ 31-70) 340-2016	Fonctionnaire autorisé Chambonnet, F

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande Internationale No.

PCT/FR 94/01284

C.(uite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
P,X	JOURNAL OF NEUROSCIENCE RESEARCH, vol.39, no.4, 1 Novembre 1994 pages 506 - 511 PEREZ-CRUET, M.J. ET AL. 'Adenovirus mediated gene therapy of experimental gliomas' voir le document en entier ----	1-7
P,X	CANCER RESEARCH, vol.54, no.20, 15 Octobre 1994 pages 5258 - 5261 OSAKI, T. ET AL. 'Gene therapy for carcinoembryonic antigen-producing human lung cancer cells by cell type-specific expression of herpes simplex virus thymidine kinase' voir le document en entier ----	1
P,X	PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA., vol.91, no.8, 12 Avril 1994, WASHINGTON US pages 3054 - 3057 CHEN, S.H. ET AL. 'Gene therapy for brain tumors: regression of experimental gliomas by adenovirus-mediated gene transfer in vivo' voir le document en entier ----	1
Y	WO,A,93 19191 (CNRS INSTITUT GUSTAVE ROUSSY) 30 Septembre 1993 voir le document en entier ----	1-8,15, 17-19
Y	EP,A,0 415 731 (WELLCOME FOUNDATION LTD) 6 Mars 1991 voir le document en entier ----	1-4,8, 15,17-19
Y	WO,A,92 05262 (JOHN HOPKINS UNIVERSITY) 2 Avril 1992 voir le document en entier ----	1-7,15, 17-19
Y	EP,A,0 475 623 (REGENTS OF THE UNIVERSITY OF CALIFORNIA) 18 Mars 1992 voir le document en entier -----	1-7,15, 17-19

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux données de familles de brevets

Demande Internationale No.

PCT/FR 94/01284

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO-A-9319191	30-09-93	FR-A-	2688514
		AU-B-	3757093
		CA-A-	2102302
		EP-A-	0593755
		HU-A-	66486
		JP-T-	6508039
		NO-A-	934061
EP-A-0415731	06-03-91	AU-B-	647747
		AU-A-	6199190
		AU-B-	6458794
		CN-A-	1050899
		JP-A-	3172189
WO-A-9205262	02-04-92	AU-A-	8764391
		CA-A-	2091346
		EP-A-	0551401
		JP-T-	6501161
EP-A-0475623	18-03-92	AU-B-	653356
		AU-A-	8262991